

Aus dem Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. W. Gräf

Standardisierung des toxikologischen Ciliatentestes mit dem Einzeller Tetrahymena Pyriformis

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Reiner Hoffmann
aus Bamberg

Aus dem Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. W. Gräf

Standardisierung des toxikologischen Ciliatentestes mit dem Einzeller Tetrahymena Pyriformis

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Reiner Hoffmann
aus Bamberg

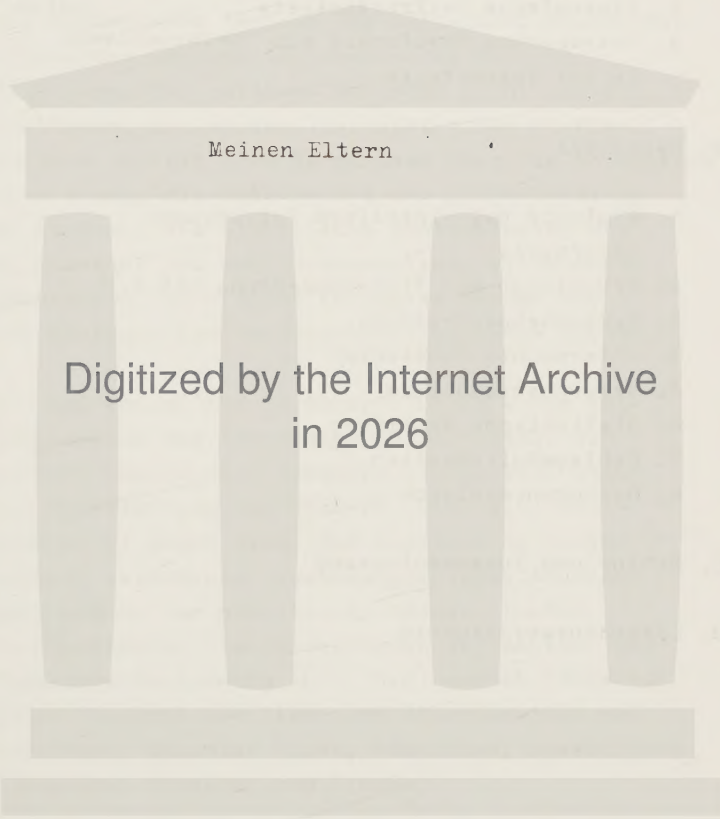
Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. W. Gräf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.1981



Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1. Biologische Toxizitätsteste	Seite	1
2. Tetrahymena Pyriformis als Testorganismus in der Toxikologie		2

B. Hauptteil

1. Biologie des Einzellers Tetrahymena Pyriformis	5
2. Grundlagen der Trübungsmessung mit T.P.	11
3. Versuchsbeschreibung	18
4. Untersuchte Substanzen	23
5. Versuchsergebnisse	26
6. Statistische Bewertung	34
7. Fehlermöglichkeiten	35
8. Methodenvergleich	39

C. Schluß und Zusammenfassung	43
-------------------------------	----

D. Literaturverzeichnis	45
-------------------------	----

A. Einleitung

1. Biologische Toxizitätsteste

Die biologische Testung der Giftigkeit chemischer Substanzen gewinnt in zunehmendem Maße an Bedeutung. Man versteht darunter nicht nur die Bestimmung der akuten Toxizität eines Stoffes. Genauso wichtig sind Kenntnisse über die chronische Einwirkung, die Speicherung und Konzentrierung in Geweben, die biologische Abbaubarkeit, die Mutagenität und das Zusammenwirken mit anderen Substanzen. Auch diese Parameter können nur mit biologischen Testverfahren gewonnen werden.

Auf dem Gebiet des Gewässerschutzes wurde beispielsweise der 48stündige Golddorfftest eingeführt und in die Deutschen Einheitsverfahren zur Untersuchung des Wassers (Lit. 5.1) übernommen. Er dient dazu, die biologische Schädigung verschieden zusammengesetzter Abwässer vergleichen und bewerten zu können. In den amerikanischen Standardmethoden der Wasser- und Abwasseruntersuchung (Lit. 5.2) werden Tests mit einer Vielzahl von Tier- und Pflanzenarten beschrieben, darunter Algen, Protozoen, Wasserflöhe, Schnecken, Korallen und Fische.

Die Verwendung von Protozoen hat gegenüber dem Einsatz höherer Wassertiere mehrere Vorteile. Protozoen lassen sich beispielsweise ähnlich wie Bakterien kultivieren, sind aber auf Grund

der Ähnlichkeit ihres Stoffwechsels mit dem von Metazoen noch eher mit diesen zu vergleichen. Bei entsprechender Wahl des Nährmediums vermehren sie sich außerordentlich rasch und ermöglichen damit die Ausschaltung von Zufallsschwankungen, da ja leicht große Zahlen von Individuen getestet werden können. Die Versuchsdauer bleibt daher auf einige Stunden bzw. wenige Tage beschränkt. Erst so wird die schnelle Überprüfung einer Vielzahl von Substanzen im Sinne eines Screeningverfahrens möglich.

Die Beurteilung hemmender Einflüsse auf die im Wasser lebenden Protozoen ist aber auch schon deswegen wichtig, weil gerade Vertreter dieses Tierstammes die erste Stufe einer Nahrungskette darstellen und wesentlich an der Selbstreinigungskraft der Flüsse bzw. an der biologischen Abwasserreinigung in Kläranlagen beteiligt sind.

2 . Tetrahymena Pyriformis als Testorganismus in der Toxikologie

Wohl einer der Ersten, der das Protozoon Tetrahymena Pyriformis für toxikologische Versuche einsetzte, war Otto Jirovec 1949 (Lit. 4.1). Damals wurde noch die Bezeichnung "Glaucoma Pyriformis" für diese Spezies verwendet. Schon Jirovec weist auf den großen Vorteil hin, den dieser Einzeller für biologische Toxizitätsteste bietet: Seine leichte Vermehrung in der reinen Kultur. Denn erst bei Ausschaltung des wechselnden

Einflusses von Begleitorganismen können reproduzierbare Ergebnisse erwartet werden. Jirovec gibt eine einfache Methode an, um die letalen Dosen verschiedener Stoffe für T.P. zu ermitteln: Nach 10, 30, 60 Minuten und 3, 6 und 24 Stunden beurteilt er die Wirkung direkt im Reagenzglas mit Hilfe eines schiefgestellten Mikroskopes und gibt die niedrigste, bei den gewählten Zeitabständen sicher abtötende Konzentration an.

Bei einem unklaren Befund unter dem Mikroskop läßt sich dieses Verfahren ergänzen, indem man nach den festgelegten Einwirkzeiten aus der Probekultur in ein frisches Nährmedium überimpft, das den Wirkstoff nicht enthält. Nach 24 Stunden sieht man dann schnell, ob noch vermehrungsfähige Zellen im Testansatz waren oder nicht.

Meßmethoden, die außer der abtötenden Giftwirkung auch den Bereich einer relativen Beeinträchtigung der Ciliaten erfassen, beruhen alle darauf, eine bestimmte Lebensäußerung heranzuziehen und deren Veränderung unter dem Gifteinfluß zu beobachten. So kann man etwa den Einfluß auf den Gasaustausch, den Nährstoffverbrauch, die Beweglichkeit oder das Wachstumsverhalten der Infusorien messen.

Wachstum und Vermehrung kann man dabei direkt an Hand der Zellzahl verfolgen. Man bedient sich dazu einer Zählkammer (Lit. 4.2) oder eines elektronischen Zählgerätes. (Lit. 4.4/4.8). Man kann auch ein indirektes Verfahren wählen und die zunehmende Trübung des Nährmediums messen, die sich bei an-

steigender Zelldichte bemerkbar macht. Gerade die letzte Methode der Trübungsmessung mit einem Photometer hat sich wegen ihres geringen Aufwandes recht gut bewährt. Allerdings weisen die Einzelmessungen oft erhebliche Abweichungen voneinander auf. (Lit. 3.2, S. 91 und 5.2., S. 761). Aufgabe dieser Doktorarbeit war es nun, die Fehlermöglichkeiten bei der Trübungsmessung mit T.P. zu analysieren und die Reproduzierbarkeit zu verbessern.

B. Hauptteil

1. Biologie des Einzellers Tetrahymena Pyriformis

Seit seiner Isolierung in axenischer Kultur 1923 durch A. Lwoff (Lit. 1.1) war der Ciliat T.P. Gegenstand einer großen Zahl von Forschungsarbeiten und kann heute als einer der am besten bekannten Vertreter der Protozoen angesehen werden (Lit. 1.2, 1.3, 1.4) Er läßt sich taxonomisch folgendermaßen einordnen:

- Stamm : Protozoen
- Klasse : Ciliaten (Wimpertierchen)
- Ordnung : Holotricha (d.h. der Körper ist allseitig bewimpert)
- Unterordnung : Hymenostomata (die Mundhöhle ist mit einer oder mehreren Membranellen ausgestattet)
- Familie : Tetrahymenidae (4 Membranellen der Mundhöhle sind immer vorhanden)
- Gattung : Tetrahymena mit mehreren Arten, darunter auch Tetrahymena Pyriformis. - (birnenförmiges Vierhäutchen).



Unter dem Mikroskop zeigt T.P. einen ovoid-birnenförmigen Körper von etwa 50 Mikrometer Breite. Dabei sind jedoch beträchtliche Formvarianten zu beobachten. 16 bis 26 Cilienreihen bedecken den größten Teil der Zelloberfläche. Die Mundöffnung liegt nahe dem vorderen Pol des Körpers. Sie hat auf einer Seite eine große und undulierende Membranelle, auf der anderen

drei kleinere. Die Analöffnung findet sich am hinteren abgerundeten Körperende. In der Mitte des Einzellers sieht man bei bestimmten Färbungen den Makronucleus, oft auch Nahrungsvakuolen.

Wie die meisten Ciliaten vermehrt sich T.P. durch asexuelle Teilung. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei Nahrungsmangel, beobachtet man auch eine sexuelle Fortpflanzung. Sie schließt eine meiotische Teilung und anschließende Befruchtung ein. Ciliaten ohne Nebenzellenkern (Mikronucleus) sind sexuell nicht vermehrungsfähig, dazu gehören auch viele im Labor gehaltene Stämme.

T.P. ist über die ganze Welt verbreitet. Es bevorzugt sehr nährstoffreiches Wasser und kommt in Teichen, Flüssen und Quellen vor. Es kann aber auch in feuchter Erde und Schlamm überleben, ist also sehr anpassungsfähig. Einige andere Vertreter der Gattung Tetrahymena sind obligate Insektenparasiten, z.B. T.chironomi. T.P. ernährt sich in seiner natürlichen Umgebung von lebenden Bakterien, aber auch von organischen Abfallprodukten. Es kann Nahrung sowohl in Partikelform als auch gelöst aufnehmen. Ersteres geschieht durch die Mundöffnung mit anschließender Bildung von Verdauungsvakuolen, letzteres durch Pinozytose und Diffusion über der ganzen Körperoberfläche.

Stoffwechsel: Obwohl Kohlehydrate und Nährmedien für T.P. meist zugegeben werden, werden sie zum Wachstum nicht obligat benötigt. T.P. kann Glukose, Fruktose, Mannose, Dextrin, Stärke und Glykogen verstoffwechseln, nicht dagegen Cellulose, Pentose und andere Polysaccharide oder Polyalkohole.

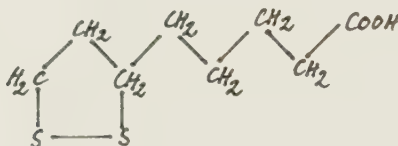
Die Abbauewege über die Glykolyse und den Zitronensäurezyklus sind praktisch dieselben wie bei höheren Tieren, allerdings besitzt T.P. einen Glyoxylatweg, es kann also Fett in Kohlehydrate umwandeln. Glycogen stellt das Reservepolysaccharit dar und ist in Glykogeninseln innerhalb der Zelle gespeichert. Endprodukte des Energiestoffwechsels sind Kohlendioxid und Wasser. Unter Sauerstoffmangelbedingungen, die T.P. über mehrere Tage erträgt, geht der Abbau nur bis zum Lactat und Acetat.

Der respiratorische Quotient liegt niedrig. Offenbar werden also Fette eher zur Erhaltung der Energieversorgung herangezogen und Kohlenhydrate mehr zu Synthesen. Auch Fette sind nicht essentiell für das Wachstum des Ciliaten. Sie können demnach alle de novo synthetisiert werden. Unter anderem auch ein spezifisches Terpenoid, das Tetrahymanol. Allerdings ändert sich der spezifische Anteil der Körperfette mit der Fettsäurezusammensetzung des Mediums.

Von den Aminosäuren sind zehn essentiell für T.P.: Histidin, Arginin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin. Dies entspricht in etwa den Aminosäurebedürfnissen höherer Tiere. Endpunkt des Stickstoffstoffwechsels ist das Ammoniumion, d.h. der Harnstoffzyklus fehlt dem Einzeller und zwar vollständig.

Überraschend ist auch die Tatsache, daß Nukleinsäuren als essentieller Nahrungsfaktor benötigt werden. Sieben Vitamine können nicht von T.P. synthetisiert werden: Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Niacin,

Pantothensäure, Folsäure und als Besonderheit
alpha-Liponsäure (Thioctsäure):



An Spurenelementen benötigt der Einzeller:
Phosphat, Magnesium, Kalium, Kupfer, Mangan,
Zink, Calcium und Eisen. Diese Nährstoff-
und Vitaminbedürfnisse wurden alle von G.W.
Kidder und V.C. Dewey (Lit. 1,2) erforscht.
Aus den angegebenen essentiellen Substanzen
und einigen weiteren, die das Wachstum verbessern,
sowie Glukose als Kohlenstoffquelle kann ein
definiertes Medium hergestellt werden. Für die
hier ausgeführten Arbeiten genügt aber eine
komplexe Nährlösung folgender Zusammensetzung:

20 g/l Proteose Pepton
5 g/l Glukose
2 g/l Hefeextrakt
evt. 90 Mikromol/l Eisen-EDTA (Lit. 5.2, S. 760)

Auch nach dem Sterilisieren gewährt dieses Medium
ein recht gutes Wachstum (vgl. Abb. 1). Allerdings
sollte nicht unnötig lange autoklaviert werden,
da sonst eine stärkere Bräunung der Nährmittel-
flüssigkeit eintritt und auch das Wachstum ver-
langsamt wird. An weiteren Wachstumsbedingungen
sind zu beachten: pH: Die Grenzen der Wasserstoff-
ionenkonzentration, die von T.P. übertragen werden,
liegen im Sauren bei pH 5,0, im Alkalischen bei

pH 8,6. Im pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,0 herrschen gute Wachstumsbedingungen (Lit. 1.4, S. 205).

Temperatur: Das Temperaturoptimum liegt zwischen 25° und 34° C. Eine Vermehrung ist noch bei 6° C möglich, die untere Grenze des Überlebens liegt noch tiefer. An höhere Temperaturen kann sich T.P. in begrenztem Maße anpassen. Die obere Grenze liegt etwa bei 40° C. Sie variiert von Stamm zu Stamm.

1) typische Wachstumskurve von Tetrahymena

Medium: 20 g/l Proteose Pepton,
5 g/l Glc,
2 g/l Hefeextrakt

t = 26° C, Reagenzgläser mit Winkel = 3°,
Volumen = 3 ml, λ = 720 mm, d = 1 cm

Tage	0	1	2	3
$E_{1/2}$ cm	20	40	149	388
	20	43	152	370
$\bar{x}_{1/2}$ cm	20	41,5	150,5	379
E_1 cm	40	83	301	758

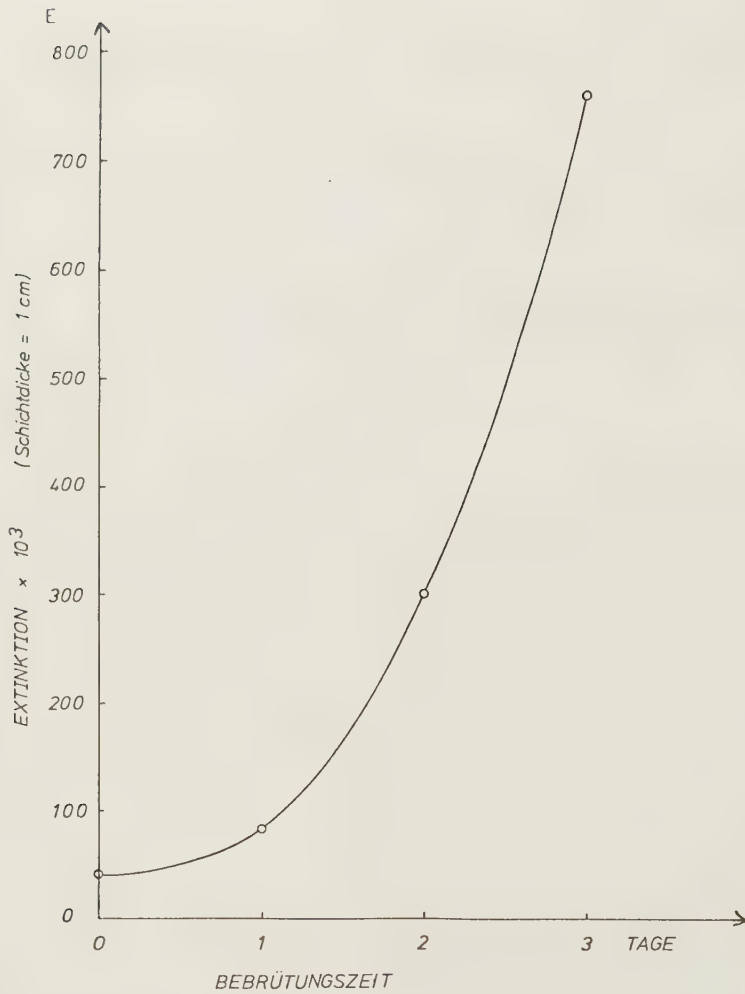


Abb. 1

Um ein ausreichendes Wachstum zu erreichen, ist es weiterhin unbedingt nötig, eine gute Sauerstoff-

versorgung der Kulturen zu gewährleisten. Dazu ist es beispielsweise vorteilhaft, die Ciliaten in schräg gestellten Reagenzgläsern oder großvolumigen Erlenmeyerkolben zu züchten.

Beobachtung: Gut bewachsene Kulturen lassen schon bei bloßem Augenschein eine deutlich sichtbare Trübung erkennen. Unter dem Mikroskop kann man die Einzeller bereits mit einer Vergrößerung von 1:100 leicht beobachten. Unbeeinträchtigte, lebende Individuen zeigen eine schraubenförmige Fortbewegungsart und bei einer stärkeren Vergrößerung sieht man deutlich den ständigen Cilien-schlag. Zur Fixierung hat sich wäßrige Sublimatlösung oder Formaldehyd bewährt, zur Färbung Osmiumsäuredämpfe oder Silbernitrat (Lit. 1.5, S. 25). Als Lebendfärbung wird Trypanblau empfohlen (Lit. 1.6).

2. Grundlage der Trübungsmessung mit T.P. (Lit. 2.1)

Durchläuft ein Lichtstrahl eine Suspension von Mikroorganismen, so wird ein Teil des Lichtes von den Zellen absorbiert, ein anderer Teil gestreut. Mit einem normalen Photometer wird die Summe dieser beiden Effekte erfaßt, denn es registriert nur die Schwächung eines Lichtstrahles in der geradlinigen Ausbreitungsrichtung. Daneben kann man auch die Intensität des Streulichtes in einem bestimmten Winkel messen (Nephelometrie). Dies erfordert jedoch Zusatzgeräte und ist im Allgemeinen nur dann nötig, wenn ein Vergleich mit dem ungetrübten Medium nicht möglich ist. Das logarithmische Verhältnis der Intensität des ein-

tretenden Lichtstrahles I_0 zur Intensität des aus-
tretenden Lichtstrahles I bezeichnet man als
Extinktion E (Auslöschung engl. optical density):

$$E = \log \frac{I_0}{I}$$

Gemessen wird die Extinktion durch den Vergleich zweier Spannungen, die durch den ungeschwächten und den geschwächten Lichtstrahl in zwei Photozellen erzeugt werden. Die Extinktion stellt eine dimensionslose Zahl dar. Um handlichere Werte zu erhalten, wird das eigentliche Meßergebnis noch mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Beispiel: gemessen $E = 0,400$
dokumentiert als $E = 400$

Beachtet man die auch sonst bei photometrischen Messungen geltenden Bedingungen, so können Trübungsunterschiede objektiviert werden. Auf diese Weise kann man dann recht gut die Vermehrung von Bakterien und Protozoen in flüssigen Nährmedien verfolgen. Die für die Trübungsmessung von Ciliatensuspensionen optimale Wellenlänge des Photometerfilters findet man durch Gegenüberstellung der Extinktionswerte der Nährlösung mit den Extinktionswerten einer Ciliatenlösung bei verschiedenen Wellenlängen. Wie zu erwarten ist, stört die gelbe Eigenfarbe des Nährmediums im roten Bereich des Spektrums am wenigsten (Abb. 2). Bei zunehmender Wellenlänge wird der Fehler durch die Nährflüssigkeit also sehr gering. Trotzdem werden die Ciliatensuspensionen bei den einzelnen

2) Versuch zur Bestimmung der besten Wellenlänge
für die Trübungsmessung.

Dieselbe Ciliatensuspension wird bei verschiedenen
Wellenlängen d. Photometers gemessen.

Dazu wird jeweils d. Leerwert des Nährmediums E_0
bestimmt.

$d = 0,5 \text{ cm}$

λ	720	666	620	590	570	550	530	490	470
Nährmedium E_0	65	72	83	100	108	128	145	197	280
Ciliaten u. Nährmedium E_1	152	162	182	200	210	230	248	297	390
Ciliaten ΔE	87	90	99	100	102	102	103	100	110

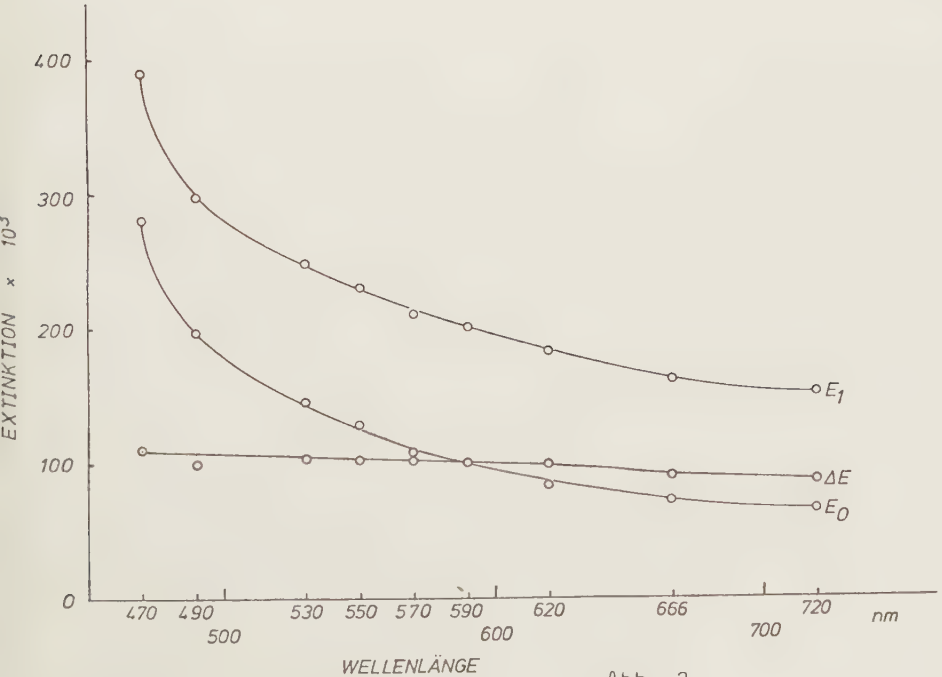


Abb. 2

Versuchen immer gegen die reine Nährflüssigkeit als Leerwert gemessen. Bei allen folgenden Versuchen wurde eine Meßwellenlänge von 720 nm gewählt.

Wegen des großen Küvettenvolumens des von uns verwendeten Photometers (Zeiss Elko II) wurde die Schichtdicke auf 0,5 cm festgelegt. Dadurch konnte das Probenvolumen in der Meßkultur auf 3 ml begrenzt und so eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden. Natürlich ist es bei der Verwendung von Photometern anderer Bauart genauso sinnvoll, eine Schichtdicke von 1 cm zu wählen.

Für klare Farblösungen gilt bei photometrischen Messungen das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = k \cdot c \cdot d$$

d.h. die Extinktion ist proportional der Konzentration c des gelösten Farbstoffes und proportional der Schichtdicke d der Meßküvette. Diese einfache Beziehung gilt nur bei der Verwendung von monochromatischem Licht und nicht zu stark konzentrierten echten Lösungen. Sie kann also nicht einfach auf die Trübungsmessung von Protozoensuspensionen übertragen werden, wenn man unter der Konzentration c hier etwa die Zahl der Protozoen pro ml versteht.

Man kann die tatsächliche Beziehung zwischen der Konzentration und der Extinktion bei der Trübungsmessung von Tetrahymenakulturen objektivieren, indem man sich Verdünnungsreihen von einer Ciliatensuspension bekannter Trübung herstellt oder auch

ein und dieselbe Suspension bei verschiedenen Schichtdicken mißt (Abb. 3 und 4). Dabei zeigt sich insbesondere bei stark getrübbten Suspensionen ein größeres Abweichen von einer linearen Konzentrations-Extinktionsbeziehung. So ergibt etwa die Messung bei 2 cm Schichtdicke in Abb. 4 einen kleineren Wert als nach der Messung bei 1 cm zu vermuten wäre. Auch im Bereich sehr kleiner Extinktionen ($E \approx 30$) findet man keine Linearität, sondern die Kurve verläuft steiler als erwartet und geht auch nicht durch den Nullpunkt. Die Nachweisgrenze der Extinktionsmessung liegt nach Johnson (Lit. 4.4) bei Zellzahlen von über 20.000/ml. Trotzdem zeigen die Abbildungen 3 und 4, daß man etwa in einem Bereich von $E = 30$ bis $E = 300$ eine lineare Beziehung zu Grunde legen kann. Auch ergeben die Versuche zur Standardisierung der Einsaat, daß man recht gut die proportionale Abhängigkeit von E und c zur Einstellung einer bestimmten Ciliatensuspension auf denselben Ausgangswert benutzen kann (vgl. S.21).

Bei der Trübungsmessung von Mikroorganismen ist weiterhin zu beachten, daß Zellen aus alten Kulturen meist kleiner sind als solche aus der exponentiellen Wachstumsphase. Gleichen Extinktionswerten kann man unter solchen Voraussetzungen nicht einfach gleiche Zellkonzentrationen zuordnen. Auch sind osmotische Effekte zu bedenken. Bei verschieden hohen Konzentrationen osmotisch wirksamer Teilchen ändert sich die Zellgröße. Die Extinktion korreliert in solchen Fällen wohl eher mit der Zellmasse.

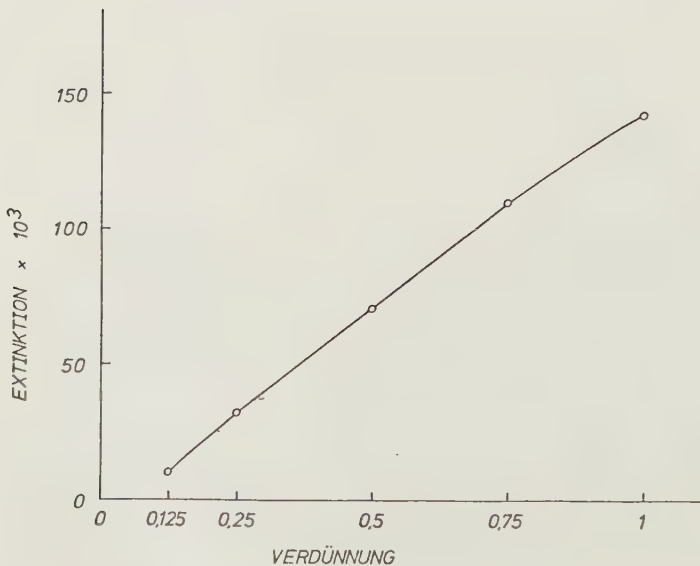
3) Verdünnungsreihe einer Ciliatensuspension

$d = 0,5 \text{ cm}$

$\lambda = 720 \text{ nm}$

Leerwert des Nährmediums: $E_0 = 70$

Verdünnung mit Nährmedium	1	0,75	0,50	0,25	0,125
	212	178	140	103	82
	210	180	140	101	78
$\bar{x}$	211	179	140	102	80
Abzug d. Leerwerts $E_0: \bar{x} - 70$	141	109	70	32	10



4) Extinktion einer Ciliatensuspension bei verschiedener
Schichtdicke d

Schichtdicke d cm		0,5	1	2
Leerwert d. Nähmed. E_0		65	80	115
Meßwert E_1		152	250	430
ΔE		87	170	315

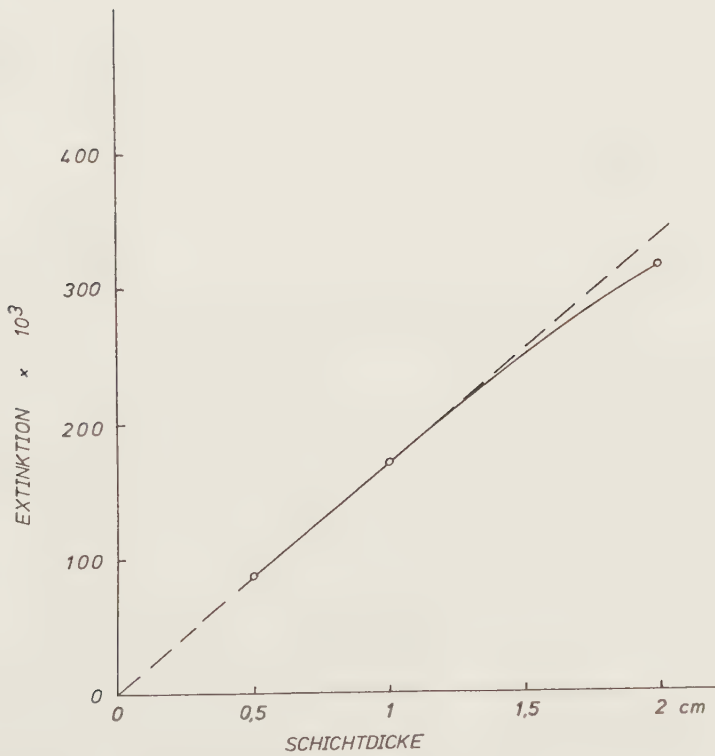


Abb. 4

3. Versuchsbeschreibung

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Stammkultur:

Die Stammkultur wird in ca. 10 stehenden Reagensgläsern in dem oben angegebenen Medium gehalten. Sie wird jede Woche neu übertragen und dient als Reserve bei etwaigen Verunreinigungen in der Kolbenkultur.

Kolbenkultur:

In großen Erlenmeyerkolben (300 ml) werden die Ciliaten einen Tag lang angezüchtet. Dabei wählt man ein nicht allzu großes Volumen, um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Es hat sich ein Volumen von 23 ml in jedem Kolben als zweckmäßig erwiesen. Es setzt sich zusammen aus 18 ml Nährmedium und 5 ml Einsaat der standardisierten Ciliatensuspension (siehe unten) des Vortages bzw. aus der Stammkultur am Anfang der Versuchsreihe. Wegen des hohen Oberflächen-Volumenverhältnisses in den Kolben erreichen die Kulturen nach 24 Stunden Wachstumsdichten von $E = 40-70$. Kulturen, die eine Extinktion von weniger als 40 auf weisen, werden verworfen.

Meßkulturen:

Diese Ciliatensuspensionen bekannter Dichte werden dann immer auf denselben Extinktionswert ($E = 40$) mit Nährflüssigkeit verdünnt. So gewinnt man eine

standardisierte Tetrahymenakultur. Ein Teil wird zur Beimpfung der Kolbenkulturen für den nächsten Tag herangezogen. Den Rest verteilt man zu jeweils 2,7 ml in Reagensgläser. Dazu kommen dann 0,3 ml der zehnfach konzentrierten Giftlösung. Diese zehnfach konzentrierte Lösung der zu untersuchenden Substanz wird also wieder auf $1:10 = 0,3 \text{ ml} / 2,7 \text{ ml} + 0,3 \text{ ml}$ verdünnt. Bei den Kontrollen gibt man an Stelle der Giftlösung 0,3 ml destilliertes Wasser hinzu. Die so angesetzten Meßkulturen werden, nachdem man sie gut gemischt hat, bei 27°C über 24 Stunden bebrütet. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, werden die Reagensgläser in einen Winkel von 30° zur Horizontalen gebracht.

Messung:

Man inaktiviert die Meßkulturen mit 0,2 ml 10%iger Formalinlösung und bestimmt dann nach gutem Mischen die Extinktion am Photometer. Von den erhaltenen Ergebnissen wird die Extinktion der reinen Nährflüssigkeit als Leerwert abgezogen.

Standardisierung der Einsaat:

Nach der Kolbenkultur befinden sich die Protozoen im Beginn der exponentiellen Wachstumsphase und man kann davon ausgehen, daß sie dann auch etwa die gleiche mittlere Zellgröße besitzen, d.h. die Extinktion kann hier als ein Maß für die Zellzahl pro ml gelten. Gleiche Extinktionswerte bedeuten dann auch gleiche Zelldichten. Die Unterschiede nach der Kolbenkultur (E = zwischen 40 und 70) werden ausgeglichen, indem man je nach

Bewuchs entsprechend verdünnt. Das Ausgangsvolumen der Kolbenkultur ist festgelegt (hier: 23 ml). Nimmt man nun eine lineare Beziehung zwischen der Zellkonzentration und der Extinktion an, so kann man die Kolbenkultur nach der Formel

$$E \cdot V = k \cdot \text{Zellzahl} = \text{konstant}$$

verdünnen.

$$\text{Es gilt also: } E_1 \cdot V_1 = E_2 \cdot V_2$$

E_1 und V_1 sind bekannt und E_2 soll immer auf den Wert 40 eingestellt werden.

V_2 berechnet sich dann wie folgt:

$$V_2 = \frac{E_1 \cdot V_1}{E_2}$$

V_2 ist aber gleich dem Volumen V_1 plus dem zugegebenen Volumen V_x

$$V_2 = V_1 + V_x = \frac{E_1}{E_2} \cdot V_1$$

$$V_x = \left(\frac{E_1}{E_2} - 1 \right) \cdot V_1$$

Dieser Ansatz bewährt sich recht gut in der Praxis (s.S.21). Bei Extinktionsmessungen so schwacher Ciliatensuspensionen ist allerdings einige Sorgfalt nötig. Insbesondere ist die Küvette vor jeder Messung mit Nährmedium zu spülen, um gleiche Meßbedingungen zu gewährleisten.

5) Versuch zur Standardisierung der Einsaat

Eine Ciliatensuspension bekannter Ausgangs-extinktion E_K soll auf eine Extinktion $E_1 = 50$, $E_2 = 40$ und $E_3 = 30$ verdünnt werden.

Meßwert der Ausgangssuspension: $X = 129$

Leerwert der Nährlösung $\rightarrow E_0 = 68$

daraus folgt $\frac{E_0}{E_K} = 61$

1. E_K soll verdünnt werden auf $E_1 = 50$.

Ausgangsvolumen $V_K = 20 \text{ ml}$

$$E_K \cdot V_K = E_1 \cdot (V_K + V_X)$$

Dabei ist V_X das zuzugebende Volumen an Nährflüssigkeit.

$$61 \cdot 20 \text{ ml} = 50 \cdot (20 \text{ ml} + V_X)$$

$$1,22 \cdot 20 \text{ ml} - 20 \text{ ml} = V_X$$

$$V_X = 4,4 \text{ ml}$$

Nach Zugabe dieses berechneten Volumens an Nährflüssigkeit zum Ausgangsvolumen V_K

konnten wir folgende Zelldichte messen:

Meßwert $X_1 = 117$, Leerwert $E_0 = 68$, daraus folgt $E_1 = 49$.

2. E_K sollte verdünnt werden auf $E_2 = 40$.

Volumen $V_K = 20 \text{ ml}$

$$E_K \cdot V_K = E_2 \cdot (V_K + V_X)$$

$$61 \cdot 20 \text{ ml} = 40 \cdot (20 \text{ ml} + V_X)$$

$$1,525 \cdot 20 \text{ ml} - 20 \text{ ml} = V_X$$

$$V_X = 10,5 \text{ ml}$$

Meßwert $X_2 = 107$, Leerwert $E_0 = 68$, daraus folgt: $E_2 = 39$.

3. E_K sollte verdünnt werden auf $E_3 = 30$!

Volumen $V_K = 20 \text{ ml}$

$$E_K \cdot V_K = E_3 \cdot (V_K + V_X)$$

$$61 \cdot 20 \text{ ml} = 30 (20 \text{ ml} + V_X)$$

$$2;03 \cdot 20 \text{ ml} - 20 \text{ ml} = V_X$$

$$V_X = 20,6 \text{ ml}$$

Meßwert $X_3 = 98$, Leerwert $E_0 = 68$, daraus folgt: $E_3 = 30$.

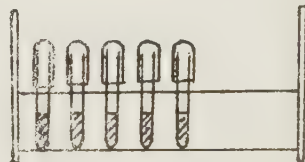
Schematisierter Versuchsaufbau

I. Stammkultur:

Dient als Reserve und zum ersten Animpfen der Kolbenkultur.

Medium: 20 g/l Proteose Pepton
5 g/l Glucose
2 g/l Hefeextrakt

stehende Reagensgläser,
Übertragung alle sieben Tage,
Volumen 5 - 10 ml.

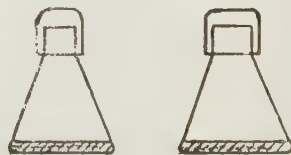


II. Kolbenkultur:

Dient zur Anzüchtung über 24 Stunden.

Temperatur: 27°C , Dunkelheit, Fassungsvermögen der Kolben: 300 oder 500 ml, Medium wie I.

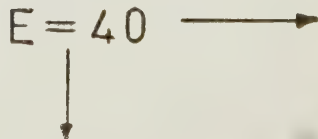
Volumen: 23 ml = 18 ml Nährmedium + 5 ml Einsaat



III. Standardisierung:

Messung der Zelldichte aus der Kolbenkultur, Verdünnen auf $E = 40$ mit Nährmedium nach E.V. = const.

Beimpfen der Kolbenkultur des nächsten Tages (à 5 ml)



IV. Meßkultur:

Jeweils 2,7 ml auf E = 40 standardisierte
Ciliatenlösung + 0,3 ml 10 fach konzentrierte
Giftlösung, mischen, 24 Stunden bebrüten.
Temperatur: 27°C, Dunkelheit, Schrägstellung 3°.



V. Messung:

Inaktivieren mit 0,2 ml 10%igem Formalin,
Mischen, Messen bei $\lambda = 720 \text{ nm}$ (jedenfalls
größer als 600 nm).
Leerwert für Nährlösung abziehen (E_0).

Anmerkung:

Die angegebenen Volumina und Extinktionswerte
kann man selbstverständlich variieren, sie haben
sich aber bewährt.
Entscheidend ist, daß man in der Meßkultur immer
vom gleichen Startpunkt ausgeht.

Giftlösung:

In ein bis zwei Vorversuchen wird der Übergangsbereich
der Giftkonzentration zwischen totaler Hemmung und
keiner Wachstumseinschränkung bestimmt. Für jeden
Versuch werden die verschiedenen Konzentrationen
des Giftstoffes neu hergestellt. Dabei wird davon
ausgegangen, daß Giftlösungen höherer Konzentration
steril sind.

4. Untersuchte Substanzen:

Name	Formel	Mol. Gewicht	ungefähre letale Dosis/Mensch
Cadmiumacetat	$\text{Cd} (\text{H}_3\text{CCOO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	266	30-50 mg Cd^{++}
Kaliumcyanid	KCN	65	50-150 mg CN^-
Quecksilber- chlorid	HgCl_2	271,5	0,2-1g Hg^{++}
Nikotin	$\text{H}_{14}\text{C}_{10}\text{N}_2$	162	50 mg

(Lit. 6.1 und 6.2)

Bei den hier angeführten Substanzen untersuchten wir die Toxizität gegenüber Tetrahymena Pyriformis in der oben beschriebenen Weise. Dabei wurden bei den ersten beiden Stoffen Cadmiumacetat und Kaliumcyanid die Untersuchungen sechsmal wiederholt, um die statistische Abweichung der Methode erfassen zu können. Die Konzentrationswirkungskurven der beiden anderen Verbindungen wurden in jeweils einem Einzelversuch bestimmt.

Cadmium:

Dieses Schwermetall gleicht in seinen chemischen Eigenschaften dem Zink, mit dem es auch in der Natur zusammen auftritt. Das Cadmium bildet mit zahlreichen Nichtmetallen Salze, z.B. CdCl_2 , CdSO_4 , CdNO_3 und Cadmiumacetat. Es findet wegen seiner Korrosionsfestigkeit in der Metallurgie vielfältige Verwendung. Eine Gefahr für die Gewässer stellen dabei insbesondere die in der Galvanikindustrie benötigten cyanidhaltigen Cadmiumsalzlösungen dar. Bei der Cadmiumintoxikation von Menschen und Tieren muß man zwischen einer akuten und einer chronischen Vergiftung unterscheiden. Cadmiumionen denaturieren Protein außerordentlich stark und erzeugen bei oraler Aufnahme größerer Mengen sehr heftige gastrointestinale Symptome. Andererseits wird Cadmium, wenn es einmal resorbiert ist, stark retiniert. Dies erfolgt u.a. in der Niere. Es kann zu Hochdruck und Niereninsuffizienz kommen. Auf Grund der chemischen Ähnlichkeit mit dem Calcium stört das Cadmium ferner den Knochenstoffwechsel. Die Folge sind Knochen-

defekte und Skelettdeformitäten.

Cadmium erweist sich außerdem als teratogen und im Tierversuch als krebserregend.

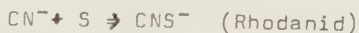
Cyanid:

Kalium- und Natriumcyanide haben große Bedeutung in der Metallhärtung. Weiterhin werden sie in einer Reihe anderer Industriezweige verwendet. Toxisch wirksam ist das CN-Ion. Dieses kann auch aus organischen Verbindungen wie Nitrilen freigesetzt werden. Zur Resorption muß das Cyanidion in der undissoziierten Form vorliegen. Im Magen von Warmblütern wird dies durch die Salzsäure erreicht:



Das Cyanidion hat zu bestimmten Schwermetallen eine hohe Komplexaffinität. Dadurch blockiert es beispielsweise das dreiwertige Eisenion der Cytochromoxidase aus der Atmungskette. Ebenso wird es an der 6. Koordinationsstelle des Hämoglobins gebunden.

So kommt es zu einem Sauerstoffmangel in den Zellen. Cyanide neigen nicht zur Kumulation im Körper höherer Tiere, da sie durch das Leberenzym Rhodanidase schnell entgiftet werden:



Quecksilber II Chlorid:

Dieses Salz ist leicht wasserlöslich. Auf Grund seiner Affinität zu den SH-Gruppen der Proteine wirkt es als starkes Enzymgift. Bei der akuten

Vergiftung stehen die Gastroenteritis und die Niereninsuffizienz im Vordergrund. Die chronische Vergiftung äußert sich in zentralnervösen Ausfällen, z.B. im Tremor mercurialis.

Verwendung findet das Hg(II)Cl_2 als Katalysator bei organischen Synthesen und es entsteht auch bei der Chlorherstellung aus den dabei eingesetzten Quecksilberelektroden. Bei unkontrollierter Einleitung stellen Abwässer aus diesen Industriezweigen eine ernste Bedrohung für die Flüsse dar.

Nikotin:

Nikotin ist das Hauptalkaloid des Tabaks. Es ist per os und perkutan stark giftig für höhere Tiere, da es die Ganglien des vegetativen Nervensystems blockiert. Nikotin wird im Körper rasch oxidativ abgebaut, d.h. eine "chronische Nikotinvergiftung" kann nicht auf der Kumulation des Wirkstoffes beruhen.

5. Versuchsergebnisse:

Die Salze Cadmiumacetat und Quecksilber(II)chlorid zeigen praktisch identische Konzentrationswirkungskurven. (Abb. 8)

Bei einer Konzentration von 1mg pro Liter dieser Stoffe ist noch ein 90%iges Wachstum im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrolle möglich. Die 50%ige Hemmungsdosis ED_{50} - also die Konzentration, bei der das Wachstum gegenüber der Kontrolle um 50% vermindert ist - kann graphisch abgelesen werden (Abb. 8), bzw. aus der Regressionsgeraden für die Wachstumswerte der Konzentrationsstufen 4, 6

und 8 mg/l errechnet werden. Beim Cadmiumacetat liegt die ED_{50} bei 5,2 mg/l (Vertrauenbereich 4,1 - 6,2 mg/l, Toleranzbereich 4,0 bis 6,4 mg/l. Im Bereich noch höherer Konzentrationen der beiden Schadstoffe tritt eine rasch zunehmende Wachstums-
hemmung ein. Dabei wird der Ausgangsextinktionswert nicht unterschritten. Selbst im Bereich der Abtötung $c = 32$ mg/l bleibt nach 24 Stunden eine Extinktion von etwa $E = 40$ erhalten (Abb. 6). Es kommt also zu keiner Lyse der Zellen. Sie werden durch die Schwermetallionen fixiert und die Trübungswerte bleiben auch nach dem Zelltod erhalten. Yamaguchi (Lit. 4.7) findet auch eine identische Toxizität von Quecksilber- und Cadmiumionen gegenüber T.P. Allerdings liegen seine ED_{50} - Werte um etwa eine Zehnerpotenz niedriger (2 $\mu\text{mol Cd}^{++}$ bzw. $\text{Hg}^{++} = 0,54$ mg/l Cadmiumacetat bzw. Quecksilberchlorid). Diese Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Untersuchungsbedingungen erklären. Yamaguchi verwendet ein weniger nährstoffreiches Medium, die Temperatur liegt bei 34°C und die Wasserstoffionenkonzentration beträgt $\text{pH} = 6,5$. Außerdem wird nichts über eine adäquate Sauerstoffversorgung ausgesagt. Andererseits liegt der Calciumgehalt des von uns benutzten Nährmediums möglicherweise höher, da dem Hefeextrakt eine unbekannte Menge Meersalz beigegeben war. Es ist bekannt, daß höhere Calciumkonzentrationen einen Schutzeffekt gegenüber toxischen Schwermetallionen haben (Lit. 4,6).

Kaliumcyanid:

Die ED_{50} liegt bei 19,2 mg/l (Vertrauensbereich 18,2 - 20,2 mg/l, Toleranzbereich 18,0 bis 20,4 mg/l). Ab einer Konzentration von 400 mg/l beobachtet man eine 100%ige Abtötung nach 24 Stunden.

Innerhalb der Fehlerbreite der Meßmethode besteht im Bereich von 5 bis 40 mg/l KCN eine lineare Beziehung zwischen der logarithmisch aufgetragenen Konzentration und der gemessenen Extinktion, bzw. dem prozentualen Wachstum. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt dabei unter 5%. Bei Schadstoffkonzentrationen größer als 80 mg/l KCN sinkt die nach 24 Stunden gemessene Extinktion deutlich unter den Ausgangswert ab (Abb. 7). Möglicherweise wird also ein Teil der Zellen abgetötet und autolysiert. Diese Zellen können dann nicht mehr mit der Trübungsmessung erfaßt werden.

Nikotin:

Denselben Effekt findet man auch beim Nikotin (Abb. 8). Überraschend ist hier die geringe Toxizität, die dieses Alkaloid gegenüber T.P. zeigt (ED_{50} ungefähr gleich 1,6 g/l). Dabei beruht die beobachtete Hemmwirkung wohl eher auf der alkalischen pH-Verschiebung, denn durch Zusatz eines Puffers kann die tödliche Grenzkonzentration zu noch höheren Werten hin verschoben werden. Dem Nikotin fehlt offensichtlich der spezifische Angriffspunkt bei diesen Einzellern, da ja ein Nervensystem, wie es höhere Tiere besitzen, bei ihnen nicht vorhanden ist. Wie die mikroskopische Beobachtung zeigt, wird auch die Cilienbewegung durch die hohe Nikotinkonzentration von 1g/l nicht nennenswert beein-

trächtigt. Bei niedrigen Nikotinkonzentrationen (c kleiner 100 mg/l) beobachtet man einen Anstieg der Extinktion auf Werte über diejenigen der Kontrolle. Ähnliches beobachteten Wyatt und Townsend bei niedrigen Rubratoxindoxen (Lit. 3.9). Dieser Anstieg beruht wohl am ehesten auf einer Zunahme der mittleren Zellgröße und nicht auf einer tatsächlich höheren Zellzahl pro Millimeter. Eventuell beeinträchtigen diese Stoffe als erstes die Zellpermeabilität, was zu einer Aufquellung der Zellen führt, ohne schon die Vermehrung zu beeinträchtigen.

6) Cadmiumacetat 6 Versuche, Extinktion gemessen gegen Nährmedium als Leerwert

Konzentration	C :	0	1	2	4	6	8	16	32	mg/l
Extinktionswerte E :		166	155	140	100	62	46	41	1e	38 ↓
		140	130	122	94	53	46			
		149	133	124	94	63	48			
		144	120	112	88	60	42			
		162	139	128	110	78	47			
		149	123	118	88	57	49			
Mittelwert: $\bar{E}$		152	133	124	96	62	46			
Standardabweichung: S		10,2	12,6	9,6	8,3	8,6	2,4			
Variationskoeffizient										
V %		7%	9%	8%	9%	14%	5%			

Prozentuale Auftragung (Kontrolle K = 100%)

Konzentration C:	0	1	2	4	6	8	16	32 mg/l
	100	93	84	60	37	28	25 le	23 †
	100	93	87	67	38	33		
	100	89	83	63	42	32		
	100	83	78	61	42	29		
	100	86	79	68	48	29		
	100	83	79	59	38	33		

Mittelwert: $\bar{E}$ 100 88 82 63 41 31 25 23

Standardabweichung

S: 0 4,6 3,6 3,7 4,1 2,3

Variations-

koeffizient V% 0% 5% 4% 6% 10% 7%

le = lebend

† = tot

Der Ausgangsextinktion $E = 36$ entspricht ein Prozentualwert von 24% Wachstum gegenüber der Kontrolle.

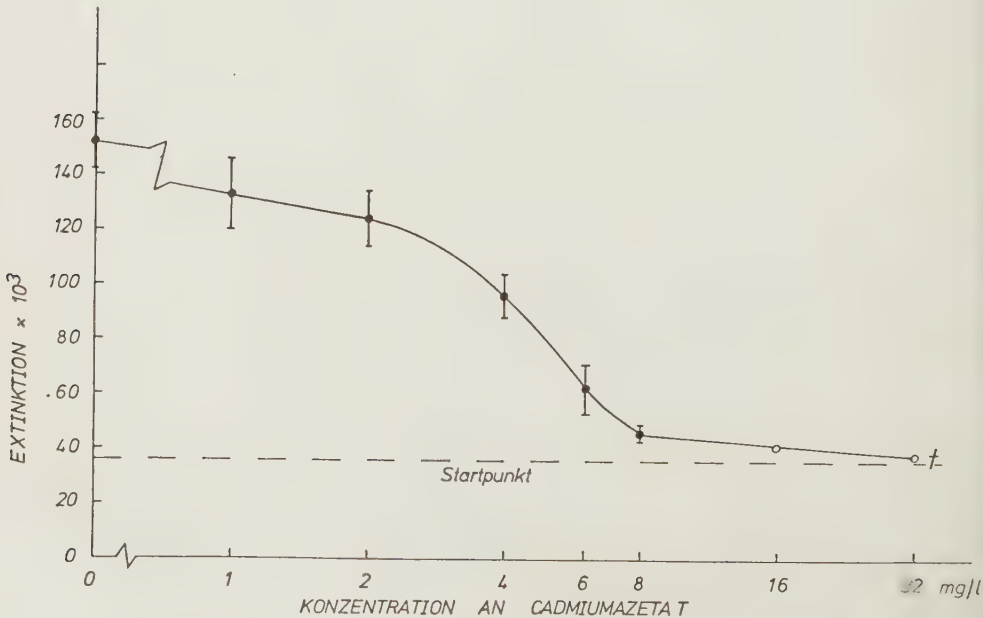


Abb. 6

7. Kaliumcyanid 6 Versuche, Extinktion gemessen gegen Nährmedium als Leerwert.

Konzentration C:	0	2,5	5	10	20	40	80	200	400	mg/l	KCN
Extinktion E	: 158	139	119	100	78	58					
	167	148	130	107	80	63	37	22	1e	16	†
	160	139	125	95	72	55	35				
	154	134	117	92	79	59	40				
	177	154	139	113	83	62	44				
	166	147	132	110	83	58	44				
Mittelwert $\bar{E}$	164	144	127	103	79	59	40				
Standardabweich. S	8,2	7,4	8,3	8,4	4,1	3,0	4,1				
Variationskoeffizient V%	5%	5%	7%	8%	5%	5%	10%				

Prozentuale Auftragung (Kontrolle = 100%)

Konzentration C:	0	2,5	5	10	20	40	80	200	400	mg/l	KCN
	100	88	75	63	49	37					
	100	87	78	64	48	38	22	13	1e	10	†
	100	87	78	59	45	34	22				
	100	87	76	60	51	38	26				
	100	87	79	64	47	35	25				
	100	89	80	66	50	35	27				
Mittelwert: $\bar{E}$	100	88	78	63	48	36	24				
Standardabweichung S	0	1,1	1,9	2,7	2,2	1,7	2,3				
Variationskoeffizient V%	0%	1%	2%	4%	4%	5%	9%				

1e = lebend

† = tot

Der Ausgangsextinktion $E = 36$ entspricht ein Prozentualwert von 22% Wachstum gegenüber der Kontrolle.

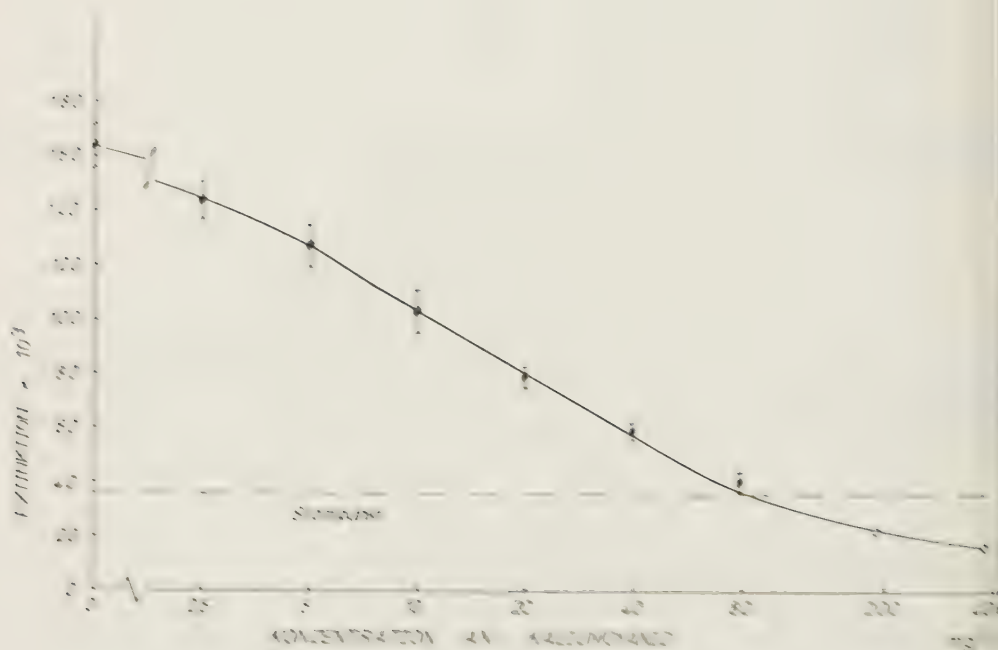


Abb. 7

Вспомогательная таблица для вычисления коэффициента диффузии

Концентрация	0	0	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Среднее значение	2	1,49	1,24	1,09	0,94	0,81	0,70	0,60	0,51	0,43	0,36	0,30	0,25
Среднее значение	2	1,00	0,75	0,50	0,25	0,00	-0,25	-0,50	-0,75	-1,00	-1,25	-1,50	-1,75

Вспомогательная таблица для вычисления коэффициента диффузии

Nikotin 1 Versuch

Konzentration C :	0	10	10 ²	320	10 ³	3200	10 ⁴	mg/l Nikotin
Extinktion E :	133	141	140	131	105	25†	24†	
Prozent-Werte :	100%	106%	105%	99%	79%	19%	18%	

† = tot

Der Ausgangsextinktion E = 36 entspricht ein Prozentualwert von 27% Wachstum gegenüber der Kontrolle.

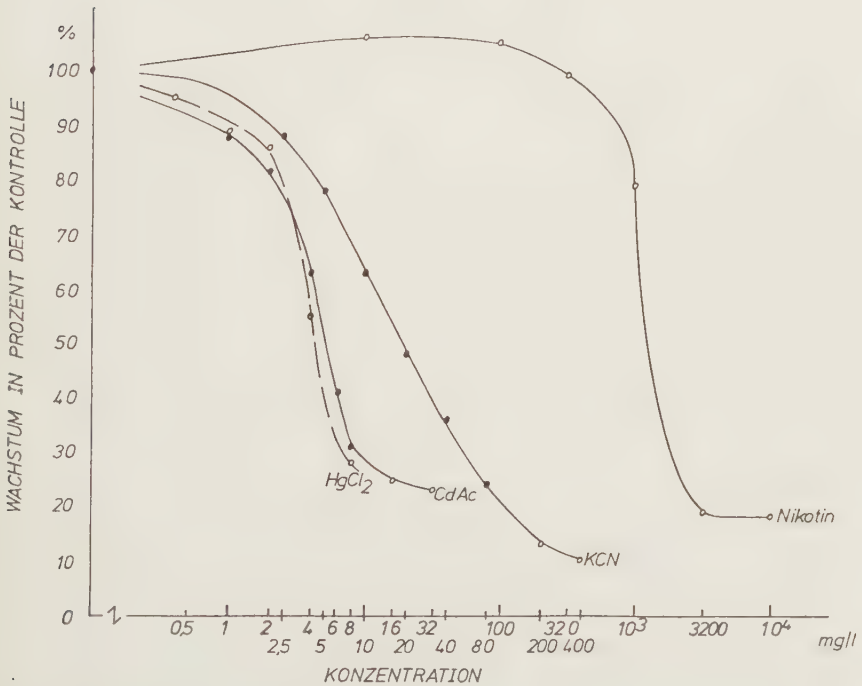


Abb. 8

6. Statistische Bewertung der Ergebnisse (Lit. 7.1, 7.2, 2.1)

Der Variationskoeffizient, der sich aus dem Verhältnis von Standardabweichung zum Mittelwert der sechs Einzelversuche berechnet, liegt für die Ergebnisse beim Cadmiumacetat in der absoluten Auftragung zwischen 5 und 14 % (Abb. 6). Die prozentuale Darstellung verringert ihn auf Werte zwischen 4 und 10 %. Durch Benutzung von nicht gealtertem Medium (vergl. Seite 37) im KCN-Versuch konnte die Streuung der Ergebnisse weiter eingengt werden (Abb. S. 31). Auch die Wachstumsdichte der Kontrollen aus der KCN-Meßreihe nahm dadurch geringfügig gegenüber den Werten des Cadmiumversuches zu. Führt man bei jeder Versuchsreihe für alle Konzentrationsstufen zwei oder drei Parallelkulturen mit, wie dies Wyatt und Townsend tun (Lit. 3.9), so kann das nur dazu dienen, Pipettierfehler und eventuelle Abweichungen bei der Photometrischen Messung getrennt zu erfassen. Es ist nicht sinnvoll, Ergebnisse dieser Parallelkulturen in eine statistische Bewertung der Versuchsmethode einzubeziehen, denn sie sind ja nicht allen Variationen unterworfen, die bei einer vollständigen Versuchswiederholung (am besten an einem anderen Tag) auftreten können.

Wir berechneten die Regressionsgerade für die Konzentrationsstufen 4, 6 und 8 mg/l CdAc, bzw. 5 bis 40 mg/l KCN. Die dazu ausgeführten statistischen F-Teste ergaben eine gute Übereinstimmung der Streuung der Einzelmesswerte um ihren Mittelwert mit der Streuung der Mittelwerte um die Regressionsgerade. An Hand der ermittelten Regressions-

geraden können dann die ED_{50} -Werte mit ihrem zugehörigen Vertrauens- und Toleranzbereich berechnet werden (Lit. 7.2).

7. Fehlermöglichkeiten

Durch das Mitführen einer Kontrollkultur bei jeder Meßreihe wird eine ganze Reihe von Einflüssen ausgeglichen, die die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse beeinträchtigen können.

So fallen bei der hier gewählten Versuchsmethodik geringe Schwankungen der Bebrütungsdauer, der Temperatur und der Ausgangsextinktion kaum ins Gewicht, wenn man die Meßwerte auf die unbeeinflusste Kontrolle bezieht und in Prozentwerte umrechnet. Dennoch sollte man sich bemühen, auch bei den tatsächlich gemessenen Extinktionen erträgliche Streubreiten zu erzielen. Nur dann kann man von wirklich wiederholbaren Messungen sprechen und sicher sein, daß man alle wichtigen äußeren Einflüsse auf das Ergebnis im Griff hat.

Im Folgenden sind nun einige Fehlermöglichkeiten aufgeführt, die uns beim Ciliatentest mit T.P. als wesentlich erscheinen.

Sauerstoffversorgung:

Bei Sauerstoffmangel in den Meßkulturen wird ein Stoff meist giftiger erscheinen, als er es tatsächlich ist. Dies kann bei einem ungenügenden Oberflächenvolumenverhältnis im Reagensglas oder Erlenmeyerkolben sehr schnell auftreten. Bei Versuchen wie den hier aufgeführten, die das Wachstumsverhalten der Einzeller

als Meßparameter heranziehen, wird durch Sauerstoffmangel außerdem die Versuchszeit unnötig verlängert. Schon bei 3 ml Volumen ist das Wachstum der Kulturen im stehenden Reagensglas gegenüber einem bei 3° zur Waagrechten liegenden deutlich langsamer. So hat sich eine Ciliatenkultur im stehenden Reagensglas von der Ausgangsextinktion $E = 40$ in 24 Stunden auf etwa $E = 80$ entwickelt, während im liegenden Reagensglas bei gleicher Ausgangsextinktion in der gleichen Zeit Werte von E über 160 erreicht wurden.

pH-Wert:

Bei manchen Stoffen beruht die Hemmwirkung zum Teil auf einer durch sie verursachten Änderung der Wasserstoffionenkonzentration. Will man diesen Einfluß ausschalten, so muß durch Zugabe eines Puffers der pH Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 gehalten werden, der für das Wachstum von T.P. am geeignetesten ist.

Licht:

Einige Substanzen zeigen erst bei Bestrahlung der Kulturen mit UV-Licht eine erhöhte Cytotoxische Wirkung. Es handelt sich hierbei um den sogenannten Photodynamischen Effekt (Lit. 3.11 und 4.5). Dieser Einfluß ist bei der Bebrütung in der Dunkelheit auszuschalten.

Medium:

Benützt man eine andere Zusammensetzung des Mediums als oben angegeben (vergl. S. 8), so muß man sich

erst in Vorversuchen davon überzeugen, ob es auch ein ähnlich gutes Wachstum gewährleistet. Der Zusatz von Tween 80, einem synthetischen Lipid ist nicht sinnvoll, da das photometrisch beobachtete bessere Wachstum (Lit. 1.2) nur ein scheinbares ist. Der Stoff wird im Ciliaten gespeichert und bewirkt eine erhöhte Lichtabsorption. Die Zahl der Ciliaten wird nicht erhöht. (Lit. 1.3, S. 68). Läßt man das Medium mehrere Tage stehen, so sedimentiert es und kristallisiert z.T. wieder aus. Man beobachtet dann einen Anstieg des Leerwertes der Nährflüssigkeit, die Standardisierung der Einseed wird erschwert und auch das Wachstum wird verzögert. Andererseits brauchen die Ciliaten in ihrem Nährmedium kleinste Partikel, denn steril filtrierte Nährmedium ist wesentlich ungünstiger als autoklaviertes. (Lit. 1.3, S. 16). Wechselwirkungen der Nährflüssigkeit mit dem Teststoff sind nicht auszuschließen. Wegen seines hohen Proteingehaltes zeigt das hier angegebene Medium beispielsweise eine gute Ionenbindungsfähigkeit und Pufferkapazität. Ein höherer Calciumgehalt erweist sich als Schutzfaktor gegenüber Schwermetallgiften (Lit. 4.6).

Standardisierte Einseed:

Nur, wenn sich eine möglichst gleich alte und gleich konzentrierte Ciliatensuspension im Testansatz befindet, kann man reproduzierbare Ergebnisse erwarten. Ciliaten aus der stationären Wachstumsphase erweisen sich nämlich oft als deutlich empfindlicher gegenüber Schadstoffen. Aber auch die Zelldichte am Anfang des Versuches beeinflußt die Ergebnisse beträchtlich. Schon als Folge der exponentiellen

Wachstumsrate und deren Verlangsamung auf Grund der Giftwirkung muß man bei Versuchswiederholungen, die von einem unterschiedlichen Startpunkt ausgehen, mit Verschiebungen der Konzentrationswirkungskurve rechnen (Lit. 2.1, S. 298 ff).

Bebrütungsdauer:

Verlängert man die Bebrütungszeit unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen auf über 48 Stunden, so ergibt sich eine Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve in Richtung auf höhere Schadstoffwerte hin. Die Kontrolle nähert sich dann bereits der Wachstumsgrenze und die Kulturen mit einem langsameren Wachstum können dem gegenüber aufholen (Lit. 2.1, S. 298). Bei einer zu kurzen Versuchsdauer wird dagegen die Konzentrationswirkungskurve zu flach verlaufen und die Trennschärfe zwischen den einzelnen Trübungswerten zu gering ausfallen.

Wirkstoff:

Bei der Herstellung von Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen ist besonders auf ein sorgfältiges Pipettieren und Mischen zu achten. Bei jeder Weiterverdünnung wirkt sich ja ein eventueller Fehler stärker aus.

Bewahrt man schwache wässrige Lösungen von Metallsalzen in Glasgefäßen auf, so werden Metallionen an das Glas adsorbiert. Die Zugabe einer geringen Menge Säure verhindert dies. Flüchtige Stoffe dampfen bei längerem Stehen an der Luft aus der wässrigen Lösung ab, aus

Kaliumcyanidlösungen beispielsweise Blausäure:



Wasserunlösliche Stoffe können bei Suspensierung in Wasser mit Aceton oder Polyalkohol als Lösungsvermittlern milchige Trübungen ergeben, die die Messung beeinträchtigen. Zellkonzentrationen sind dann nur mit Hilfe der direkten Zählkammermethode oder elektronisch mit einem Coulter-Counter zu bestimmen.

8. Methodenvergleich

Schon bei der Aufklärung der essentiellen Nährstoffbedürfnisse von T.P. setzten G.W. Kidder und V.C. Dewey die photometrische Trübungsmessung ein (Lit. 1.2, 3.1). Dabei verwendeten sie ein Medium, das aus verschiedenen Aminosäuren, Vitaminen und Mineralien synthetisch zusammengesetzt war. Gerade der zu untersuchende Nahrungsfaktor fehlte. Durch Zugabe dieses Stoffes in steigender Konzentration und einer korrespondierenden besseren Vermehrung der Einzeller konnten sie den gewünschten Nachweis führen. Die dabei gewonnenen Erfahrungen setzten sie dann bei Versuchen mit verschiedenen Antimetaboliten Nährstoffanaloga ein (Lit. 3.2). G.W. Kidder und V.C. Dewey verwendeten ein schnell ansprechendes Photometer und konnten so die Zelldichte der lebenden Ciliaten direkt im Reagensglas messen. Zwar sind dabei die Meßergebnisse nicht ganz so genau, da die Ciliaten zur Oberfläche steigen, aber andererseits bringt diese direkte Messung doch Vorteile. Die Verwendung eines definierten Mediums erscheint uns für wasser-

toxikologische Untersuchungen zu aufwendig, auch wird die Versuchsdauer (96 Stunden) dadurch recht lang. Die Versuchsbedingungen, die für den Cilientext mit T.P. in den amerikanischen Standardmethoden der Wasseruntersuchung angegeben werden (Lit. 5.2, S. 759 ff), sind aus der Veröffentlichung von N.R. Cooley und anderen (Lit. 3,5) übernommen. Diese Autoren untersuchten den Einfluß verschiedener polychlorierter Biphenyle auf den Einzeller. Nach einer Bebrütungszeit von 0,4, 8, 16, 24, 36, 48 und 96 Stunden ermittelten sie die Parameter der exponentiellen Wachstumsphase und deren Veränderung unter dem Stoffeinfuß. Der gesamte Versuchsaufwand ist demnach recht groß. Dazu kommt, daß die von Cooley angegebene Wellenlänge der photometrischen Trübungsmessung mit 540 nm nicht im optimalen Bereich liegt. Auch die Sauerstoffversorgung bei 10 ml Probevolumen und einer Schrägstellung der Reagensgläser auf 60° ist als unzureichend anzusehen.

T.D. Wyatt und R.J. Townsend (Lit. 3.6) bestimmten die Giftigkeit von Rubratoxin A und B aus *Penicillium rubrum* gegenüber T.P. Sie erreichen durch eine Vorkultur und eine grobe Einstellung der Anfangsextinktion auf Werte zwischen 40 und 60 recht gute Variationskoeffizienten zwischen 3 und 5%. Die Variation wird jedoch nur bei unterschiedlich lang bebrüteten Kontrollkulturen ohne Giftzugabe ermittelt. Der eigentliche Versuchszweck lag in einem Vergleich der Toxizität

von reinen und gemischten Rubratoxinpräparaten. Die Autoren erreichten dies, indem sie die Steigungen der erhaltenen linearen Konzentrationswirkungsbeziehungen verglichen (Parallel-Linienverfahren).

Yamaguchi und andere (Lit. 4.7) untersuchten die Wirkung verschiedener Metalle auf T.P. (Cd, Hg, Se, Mn, Zn, Cu, Ca und Mg). Nach der Bebrütung mit dem Giftstoff zentrifügierten sie die Kulturen, wuschen sie mit Pufferlösung und bestimmten den Proteinzuwachs nach der Methode von Lowry. Dies scheint uns gegenüber der direkten Trübungsmessung ein unnötiger zusätzlicher Arbeitsschritt zu sein. Allerdings kann dies bei Stoffen, die selbst im roten Spektralbereich absorbieren oder bei der Bewertung von schon getrübbten Flüssigkeiten durchaus angebracht sein.

Von den Methoden, die auf eine photometrische Trübungsmessung verzichten, erscheinen uns die von Jirovec, Carter, Persoone und West als sehr gut brauchbar. Die Versuchsmethode von Jirovec, mit der eine Beziehung zwischen der Wirkstoffkonzentration und der Abtötungszeit hergestellt werden kann, wurde bereits in der Einleitung beschrieben. Sie kommt außerdem in den Arbeiten von Epstein (Lit. 4.5), Bauer (Lit. 4.11) und Moravcova (Lit. 4.10) zur Anwendung.

Carter und Cameron (Lit. 4.6) bringen mit Hilfe einer Mikropipette zwischen 20 und 100 Ciliaten

auf ein Testplättchen in Wasser ein. Dann geben sie den zu untersuchenden Stoff in der entsprechenden Verdünnung dazu. Nach 0, 0,5, 1, 2, 24, 48, 72 und 96 Stunden zählen sie die noch lebenden Ciliaten. Die erhaltene Absterbekurve vergleichen sie mit einer unbbeeinflußten Kontrolle. Verwendet werden dabei Ciliaten aus der stationären Wachstumsphase, damit das Ergebnis nicht durch Zellteilungen verfälscht wird.

Persooone und Uyttersprot (Lit. 4.9) benutzen den Meeresciliaten *Euplotes vannus* Müller. In einen Tropfen Nährmedium mit der zu untersuchenden Giftkonzentration wird mit einer Mikropipette genau eine Zelle eingebracht. Sie stammt aus einer Kultur der exponentiellen Vermehrungsphase. Nach 48 Stunden wird fixiert und aus der Zahl N der jetzt vorhandenen Zellen auf die Zahl X der abgelaufenen Generationsfolgen geschlossen ($2^X < N < 2^{X+1}$). Die Kontrollen erreichen dabei Zellzahlen von etwa 60, was ungefähr 6 Generationsfolgen entspricht. Unter dem Einfluß der Schadstoffe wird entweder der Ciliat ganz abgetötet oder aber die Vermehrungsrate ist geringer.

R.A. West (Lit. 4.3) gibt eine Methode an, bei der sich verschiedene Einzeller, darunter auch T.P. in Kolonien auf feuchtem Agar vermehren können. Die Testung von Wirkstoffen erfolgt dann nach dem Agardiffusionsverfahren.

Neben den hier besprochenen Arbeiten gibt es noch eine ganze Reihe weiterer, in den T.P.

als Testobjekt für pharmakologischtoxikologische Untersuchungen eingesetzt wird. Sie widmen sich aber meist speziellen Fragestellungen und die Versuchsmethodik ist dementsprechend aufwendiger gestaltet (Lit. 1.4, S. 42o ff).

C. Schluß:

Wegen seines geringen Aufwandes und seiner schnellen Durchführbarkeit läßt sich der Ciliatentest mit *Tetrahymena Pyriformis* sehr gut dafür verwenden, eine große Anzahl wassergefährdender Stoffe durchzutesten. Gerade auch das Zusammenwirken verschiedener Substanzen kann mit ihm schnell und sicher quantifiziert werden (Lit. 3.4, 4.11). In Fällen, in denen andere Verfahren (Lit. 5.3, 5.4) wegen mangelnder Geräteausstattung ausgeschlossen sind, ermöglicht der Ciliatentest wenigstens eine vorläufige toxikologische Bewertung. Wie das Beispiel des Nikotins zeigt, dürfen Analogieschlüsse auf die Verhältnisse bei höheren Tieren nur mit Vorsicht vollzogen werden.

Immer wird die im Labor gewählte Versuchsmethodik gegenüber den natürlichen Verhältnissen im Gewässer eine gewisse Abstraktion darstellen. Dennoch ist dieser Schritt notwendig, denn nur so können Schadwirkungen in einem überschaubaren und verstehbaren System studiert werden. Dabei ist die Standardisierung der Ausgangs-

bedingungen eine wesentliche Voraussetzung, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und eine vergleichende Bewertung toxischer Substanzen zu ermöglichen! Unsere Versuche zeigen, daß dies beim Ciliatentest mit *Tetrahymena Pyriformis* mit wenigen zusätzlichen Arbeitsschritten erreicht werden kann.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit werden

1. die Grundlagen der Trübungsmessung mit *Tetrahymena Pyriformis* als toxikologischer Ciliatentest dargestellt
2. der Versuchsaufbau zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse standardisiert
3. die akute Giftigkeit der Stoffe Cadmiumacetat, $HgIICl$, Nikotin und KCN gegenüber T.P. ermittelt
4. die Fehlermöglichkeiten der Meßergebnisse eingehend analysiert.

D. Literaturverzeichnis

1. Biologie von Tetrahymena Pyriformis

- 1.1 A. Lwoff 1923 Sur la nutrition des infusoires
Comp. rend. Acad. Sci. vol 176 S. 928 - 930
- 1.2 W. Kidder, V.C. Dewey 1951 The biochemistry of
ciliates in pure culture
In: A. Lwoff, ed., Biochemistry and physiology of
protozoa vol. 1 New York 1951 S. 323 - 400
- 1.3 D.L. Hill 1972 The biochemistry and physiology of
Tetrahymena New York
- 1.4 A.M. Elliott 1973 Biology of Tetrahymena Stroudsburg
USA
- 1.5 Matthes F, Wenzel 1966 Wimpertiere Stuttgart
- 1.6 J. Burmeister 1974 Z. für Allgemeine Mikrobiologie
Band 14, S. 479 - 485

2. Trübungsmessung

- 2.1 W. Oberzill 1966 Mikrobiologische Analytik Nürnberg

3. Trübungsmessung mit Tetrahymena Pyriformis

In den Klammern stehen die jeweils untersuchten Stoffe

- 3.1 G.W. Kidder, V.C. Dewey 1948, Dietary factors in the utilization of homocysteine, Proceedings of the National Academy of Science USA 34, S. 81-88 (Homocystein)
- 3.2 G.W. Kidder, V.C. Dewey, R.E. Parks 1951, Growth promotion in Tetrahymena by folic acid analogs, Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 78, S. 88-95 (Folsäureantagonisten).
- 3.3 J.S. Roth 1954, Certain effects of 2-aminofluorene and Cl- and Beta-naphtylamines on Tetrahymena pyriformis, Cancer Research 14: S. 346-351 (aromat. Amine).
- 3.4 R.L. Conner, M. Nakatani 1958, Stigmasterol antagonism of certain growth inhibitors of Tetrahymena pyriformis, Archives of biochemistry and biophysics 74: S. 175-181 (Colchicin, Stigmasteril)
- 3.5 N.R. Cooley u.a. 1972, 1973, The Polychlorinated Biphenyls Mirex and Arochlors 1248, 1254, 1260: Effect on and Accumulation by Tetrahymena Pyriformis, Jour. of Protozoology 19: S. 636-638 und Jour. of Protozoology 20: S. 443-445. (Polychlorierte Biphenyle)
- 3.6 T.D. Wyatt, R.J. Townsend 1974, The Bioassay of Rubratoxins A and B using Tetrahymena Pyriformis strain w Jour. of General Microbiology vol 80: S. 85-92 (Rubratoxin A und B)

- 3.7 W. Gräf, A.G. Haller 1977, Die Phototoxizität kanzerogener polyzyklischer Aromate und ihrer Umwandlungsprodukte im biologischen Modellversuch. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164, S. 250-261 (Polyzyklische Aromaten, Fluoridion)

4. Weitere toxikologische Ciliatenteste

- 4.1 O. Jirovec 1950, Das Infusorium Glaucoma pyriformis als Testobjekt in Pharmakologie und Physiologie, Schweiz. Z. für Pathologie und Bakteriologie vol 13: S. 129-138 (Desinfektionsmittel, Alkaloide).
- 4.2 Teunisson D.J. 1961, Mikrobiological assay of intact protein using Tetrahymena pyriformis w, Analytical Biochemistry 2: S. 405-420
- 4.3 R.A. West u.a. 1962, The agar layer method of determining the activity of diverse materials against selected protozoa, Jour. of Protozoology 9: S. 65-73
- 4.4 I.S. Johnson u.a. 1962, Comparative studies with chemotherapeutic agents in biologically diverse in vitro cell systems, Cancer research 22: S. 617-626 (Antibiotika)
- 4.5 S.S. Epstein u.a. 1964, On the association between photodynamic and carcinogenic activities in polycyclic compounds, Cancer research 24: S. 855-862 (Polyzyklische Aromaten)

- 4.6 J.W. Carter, I.L. Camerón 1973, Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*, Water research 7: S. 951-955 (Metallsalze)
- 4.7 N. Yamaguchi u.a. 1973, Detection heavy metal toxicity by *Tetrahymena Pyriformis* culture method, Industrial Health 11: S. 27-31 (Metallsalze)
- 4.8 G.B. Silberstein, A.B. Hooper 1974, The effect of the herbicid 2,4,5 T on the growth and metabolism of *Tetrahymena Pyriformis*, Jour. of Cell Physiology 85: S. 331-338 (Herbizid 245 T)
- 4.9 G. Persoone, G. Uyttersprot 1975, The influence of inorganic and organic pollutants on the rate of reproduction of a marine hypotrichous ciliate: *Euplotes Vannus Müller*, Revue Internationale d'Océanographie Médicale Nr. 37/38, S. 125-151 (Schwermetalle, Pestizide und PCB)
- 4.10 V. Moravcova 1976, Axenic cultures of *Tetrahymena Pyriformis* as toxicological Tools, Acta hydrochemica et hydrobiologica vol 4, S. 83-94 (Pestizide, Phenol)
- 4.11 L. Bauer 1977, Über die Steigerung phototoxischer Wirkungen polyzyklischer Aromate durch Haushalts-spülmittel (Tenside), Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164, S. 455-468

5. Andere Toxizitätsteste

- 5.1 H. Mann 1975, Der Goldorfentest, Vom Wasser Bd. 44, S. 1-13

- 5.2 ----- 1975 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 14. Auflage Washington D.C.
- 5.3 K. Reimann 1977 Toxizitätsteste Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fisch- und Flußbiologie Bd. 27, S. 90-104
- 5.4 G. Bringmann 1978 Bestimmung der biologischen Schädigung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen Z. f. Wasser- und Abwasserforschung 11, S. 210-215

6. Untersuchte Stoffe

- 6.1 O.A. Neumüller 1972 Römpps Chemielexikon Stuttgart
- 6.2 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel 1975 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie Mannheim

7. Statistik

- 7.1 L. Cavalli-Sforza 1974 Biometrie Stuttgart
- 7.2 Documenta Geigy 1968 Wissenschaftliche Tabellen Basel, siehe auch unter 2.1 und 6.2

L e b e n s l a u f

Am 12.6.1954 wurde ich als Sohn von Erich Hoffmann und seiner Ehefrau Bertl, geb. Böse, in Bamberg geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule Ziegelhütten, ab September 1964 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasiums in Kulmbach.

Die elfte Klasse verbrachte ich in Pennsylvania, USA, als Austauschschüler an einer amerikanischen Highschool.

Im Juni 1973 beendete ich das Gymnasium mit dem Abitur.

Bis September 1974 leistete ich meinen 15-monatigen Bundeswehrdienst im Gebirgsjägerbataillon 222 in Mittenwald.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen.

Die Vorprüfung bestand ich im Sommer 1976, den ersten Teil der ärztlichen Prüfung im Sommer 1977, den zweiten Teil im Sommer 1979. Das Praktische Jahr absolvierte ich an der Chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Fürth, an der Universitäts HNO-Klinik und an der Medizinischen Universitätsklinik in Erlangen. Als letzte Voraussetzung zur ärztlichen Approbation bestand ich im November 1980 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung.

THE HISTORY OF THE CITY OF BOSTON

IN TWO VOLUMES.
BY
JOSEPH NEALE, ESQ.
OF THE BARR, AT LINCOLN'S INN.
IN TWO VOLUMES.
LONDON: PRINTED BY J. JOHNSON, ST. PAUL'S CHURCH-YARD, 1773.
AND SOLD BY ALL THE BOOKSELLERS IN GREAT BRITAIN.
THE SECOND EDITION, CORRECTED AND ENLARGED.
LONDON: PRINTED BY J. JOHNSON, ST. PAUL'S CHURCH-YARD, 1793.
AND SOLD BY ALL THE BOOKSELLERS IN GREAT BRITAIN.

